

# Salute delle api: analisi dei fattori di rischio. Il progetto Apenet

LAURA BORTOLOTTI<sup>1\*</sup>, CLAUDIO PORRINI<sup>2</sup>, FRANCO MUTINELLI<sup>3</sup>, DANIELE POCHI<sup>4</sup>, ENZO MARINELLI<sup>5</sup>,  
CARLOTTA BALCONI<sup>6</sup>, FRANCESCO NAZZI<sup>7</sup>, MARCO LODESANI<sup>1</sup>, ANNA GLORIA SABATINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CRA - Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura, Bologna

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

<sup>3</sup>Centro di referenza nazionale per l'apicoltura, Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro (Pd)

<sup>4</sup>CRA - Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria, Monterotondo (RM)

<sup>5</sup>CRA - Centro di ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

<sup>6</sup>CRA - Unità di ricerca per la Maiscoltura, Bergamo

<sup>7</sup>Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante, Università di Udine

\* Corresponding author: [laura.bortolotti@entecra.it](mailto:laura.bortolotti@entecra.it)

## SUMMARY

### Honeybee health: study of the risk factors. The Apenet project

*During last years several outbreaks of honeybee losses have been reported all over Europe and in others countries worldwide. Recently these phenomena became extremely worrying. According to the last researches, the most likely risk factors are bee diseases, agrochemical treatments, poor beekeeping management and climatic changes. These factors can act singularly or simultaneously and can vary depending upon the local circumstances. In Italy and in other European countries one of the verified causes is the loss of active ingredient through the fan drain of pneumatic seed drills during corn sowing operations, which led to the precautionary suspension of use of all the four active ingredients registered for seed dressing: imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin and fipronil.*

*In order to give an explanation about the possible causes of colony losses and high bee mortalities reported in the recent years and to evaluate the efficacy of the cited suspension of the active ingredients used for seed dressing, the Italian Ministry of Agriculture financed a national research project, Apenet, with the following objectives: monitor a large number of hives on the national territory through a national monitoring network; improve the drilling machines and the seed dressing techniques in order to eliminate dust dispersion; evaluate pesticide effects on honeybees in relationship with environmental factors, considering both lethal and sublethal effects; determine and study pathogens involved in colony losses. Aim of the project is not only to study the different risk factors for honeybees, but also the potential interactions among factors and the possible concrete solution for the beekeeping preservation.*

## Introduzione

Da diversi anni in numerosi paesi vengono segnalati eventi di mortalità o di spopolamento di famiglie di api. Questo fenomeno, le cui cause sono molteplici e ancora sconosciute, ha assunto negli ultimi anni dimensioni preoccupanti. Negli Stati Uniti la problematica, cui è stato dato il nome di CCD (Colony Collapse Disorder), viene attribuita ad una interazione fra cause ambientali e parassiti di varia natura (Mutinelli e Granato, 2007). Le attuali ipotesi sulle cause della CCD prendono infatti in considerazione

l'infestazione da varroa, patologie nuove o emergenti, come *Nosema ceranae* (Higes *et al.*, 2006) o il virus israeliano della paralisi acuta delle api (IAPV) (Cox-Foster *et al.*, 2007), avvelenamenti da pesticidi, sia quelli utilizzati per la protezione delle colture, sia per il controllo dei parassiti dell'alveare, fattori ambientali di stress, tra cui la carenza o il basso valore nutrizionale di polline e nettare di alcune colture, la siccità, le pratiche apistiche logoranti come il nomadismo. Si ipotizza inoltre un possibile effetto immunosoppressivo sulle api causato dalla combinazione di più fattori, tra quelli sopra citati.

In Europa i ricercatori che si stanno occupando dell'argomento si sono riuniti in un Network di ricerca, il CoLoss (Prevention of honeybee COlony LOSSes), che si incontra periodicamente per scambiarsi informazioni dai vari paesi e portare avanti programmi di ricerca comuni ([www.coloss.org](http://www.coloss.org)). Su questo numero della rivista il resoconto dell'ultimo incontro del gruppo, tenutosi a Zagabria il 3 e 4 marzo 2009.

### Mortalità e spopolamento di alveari in Italia

In Italia le prime segnalazioni degli apicoltori riguardo a morie di api e spopolamenti di alveari risalgono al 1999 e sono relative principalmente al periodo primaverile-estivo e concomitanti con la semina del mais. A seguito di tali segnalazioni, nelle primavere del 2001 e del 2002, il CRA - Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API) in collaborazione con il Dipartimento di Biologia applicata alla Difesa delle Piante dell'Università di Udine, ha effettuato alcune sperimentazioni i cui risultati hanno dimostrato l'esistenza di una contaminazione ambientale conseguente alla semina del mais conciato con Gaucho (p.a. imidacloprid) (Greatti *et al.*, 2003, 2006). Nello stesso periodo sono state svolte dal CRA-API, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA) dell'Università di Bologna, alcune sperimentazioni in laboratorio e in campo, per studiare gli effetti di dosi sub-letali di imidacloprid sull'etologia delle api. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il principio attivo imidacloprid può effettivamente provocare gli effetti segnalati dagli apicoltori e cioè disorientamento, movimenti lenti e poco coordinati, difficoltà di volo e di ritorno all'alveare (Bortolotti *et al.*, 2003; Medrzycki *et al.*, 2003).

Al fine di raccogliere informazioni sugli eventi di morie o spopolamenti, il CRA-API e il DiSTA hanno predisposto un questionario che gli apicoltori possono compilare, richiedendo l'analisi dei campioni di api morte. Negli ultimi anni, fino al 2007, sono giunti un centinaio di questionari compilati da singoli apicoltori o dai Servizi Veterinari delle ASL. La maggior parte delle morie denunciate erano avvenute nel periodo corrispondente alle semine primaverili di mais e i residui maggiormente riscontrati nei campioni di api morte pervenuti e analizzati presso il CRA-API appartenevano alla classe dei neonicotinoidi. Infine, nella primavera del 2008, il fenomeno delle mortalità primaverili ha registrato una brusca impennata. L'Osservatorio Nazionale della Produzione e del Mercato del Miele, nel suo secondo rapporto sullo spopolamento degli alveari dell'aprile 2008, indica in 50.000 gli alveari

coinvolti ([http://www.osservatoriomiele.org/2\\_rapporto2008.htm](http://www.osservatoriomiele.org/2_rapporto2008.htm)). In seguito a ciò è stato organizzato, da parte di alcune regioni italiane a vocazione maidicola, Lombardia, Piemonte, Emilia Romagna, Veneto e Friuli Venezia Giulia, durante il periodo della semina del mais, un monitoraggio ufficiale che prevedeva il sopralluogo da parte dell'autorità veterinaria in seguito alla segnalazione e la raccolta di campioni per le analisi patologiche e dei neonicotinoidi usati nella concia del mais. Questa iniziativa ha portato ad acquisire dati che suggeriscono una relazione tra semina di mais conciato e mortalità delle api (Sabatini *et al.*, 2008; Bortolotti *et al.*, 2008; Mutinelli *et al.*, 2009; Porrini *et al.*, 2009). Grazie a questi dati e alle mobilitazioni delle associazioni di apicoltori, il Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali ha emesso lo scorso 17 settembre 2008 un'ordinanza di sospensione cautelativa dei principi attivi usati nella concia delle sementi (clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid e fipronil).

Tuttavia i fenomeni di mortalità delle api degli ultimi anni non sono relativi solamente al periodo primaverile e alle zone a vocazione maidicola e pertanto la semina di mais conciato deve essere considerata solo una delle cause del fenomeno. Negli ultimi anni in Italia vi sono stati intensi fenomeni di mortalità invernale, che in alcune province italiane ha raggiunto una media del 38% alla fine dell'inverno. Secondo gli apicoltori colpiti, nell'81% dei casi le cause delle morie erano la varroa e i patogeni associati. L'ipotesi formulata a tal proposito è che le condizioni meteorologiche degli ultimi anni, caratterizzate da un inverno mite e da un'estate secca, abbiano portato una elevata infestazione invernale di varroa in famiglie già in parte debilitate per la scarsità estiva di polline e nettare, con la conseguenza che molte api invernali non erano fisiologicamente in grado di svernare (Lodesani *et al.*, 2008).

Per spiegare i fenomeni di mortalità nel loro complesso, in Italia come nel resto del mondo ha preso piede l'ipotesi della multifattorialità e i fattori di rischio ritenuti più probabili sono le patologie dell'alveare, i trattamenti fitosanitari, le pratiche apistiche, l'andamento climatico, la diminuzione dei luoghi di bottinamento, lo scarso valore nutrizionale del polline raccolto, la gestione del territorio e altri ancora come le onde elettromagnetiche (Fig. 1). Potrebbero inoltre verificarsi interazioni di più fattori, sia di origine patologica che non, in cui non vi è semplicemente un effetto additivo, ma anche un effetto sinergico e moltiplicativo dei diversi fattori.

La situazione appare pertanto molto complessa, ma schematizzando, si può affermare che, almeno nel nord Italia, il fenomeno riguarda 4 periodi ricorrenti



**Figura 1** - Fattori potenzialmente implicati nei fenomeni di mortalità e spopolamento delle famiglie di api.

dell'anno: 1) gennaio-febbraio, alla ripresa dell'attività apistica, in conseguenza di stati di orfanità e/o di insufficienza di scorte; 2) marzo-aprile, in particolare in corrispondenza delle semine primaverili di alcune colture erbacee e dei trattamenti sui fruttiferi; 3) metà giugno, a causa principalmente dei trattamenti sulla vite contro *Scaphoideus titanus*, vettore della flavescenza dorata; 4) in autunno, nel periodo in cui all'elevata infestazione da parte dell'acaro *Varroa destructor*, si associa la diffusione di virusi particolarmente letali, che possono anche compromettere il corretto sviluppo delle api invernali (Porrini *et al.*, 2009).

### Il progetto Apenet

Per tentare di dare una risposta al complesso fenomeno delle mortalità e spopolamenti di famiglie di api, il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali ha finanziato un ampio progetto di ricerca, "Apenet: monitoraggio e ricerca in apicoltura", il cui obiettivo è proprio lo studio del fenomeno della mortalità delle api attraverso azioni di monitoraggio ambientale e ricerca mirata.

Il primo obiettivo del progetto è la messa a punto di una rete di monitoraggio in tutto il territorio

nazionale, costituita da moduli di rilevamento dislocati nelle regioni italiane. La funzione della rete di monitoraggio è raccogliere informazioni sullo stato di salute delle famiglie di api che compongono i moduli, attraverso vari rilevamenti e periodiche analisi di laboratorio su diverse matrici (api morte, api vive, covata, miele, cera, polline).

La messa a punto della rete di monitoraggio sarà poi accompagnata da un'ulteriore sensibilizzazione degli apicoltori nei confronti del sistema delle segnalazioni delle morie al servizio veterinario delle ASL, indispensabili per comprendere quello che accade nel territorio, come evidenziato dagli avvenimenti della primavera 2008.

I dati ottenuti dalle due azioni indicate (monitoraggio e segnalazioni) saranno utilizzati sia per ottenere risposte immediate circa lo stato di salute dell'apicoltura italiana, sia come elementi per studiare e valutare singolarmente tutti i fattori di rischio identificati.

Sul fronte della ricerca, il progetto risponde invece a due diverse esigenze, l'una contingente, cioè la valutazione dell'efficacia e degli effetti del decreto di sospensione all'uso dei tre neonicotinoidi e del fipronil nella concia delle sementi di mais; l'altra più generale, di studiare le diverse cause della mortalità delle api, sia singolarmente che in sinergia tra loro.

Nei prossimi paragrafi verranno trattate nel dettaglio le diverse categorie di fattori implicati nella moria delle api e le azioni intraprese nell'ambito del progetto Apenet per studiarli e affrontarli in concreto.

### ***Il monitoraggio e le segnalazioni***

Negli ultimi anni, in diversi Paesi europei sono stati messi a punto programmi di monitoraggio per il controllo dello spopolamento degli alveari e della mortalità delle api.

In Francia, a seguito di ingenti mortalità di alveari su colture di girasole in fioritura, oltre alla sospensione cautelativa di alcuni prodotti concianti su girasole e mais l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) ha condotto un'indagine nel quinquennio 2002-2005, i cui dati preliminari non hanno però fornito risultati chiari. I fattori che sono risultati più frequentemente collegati alle perdite di colonie sono stati varroasi e patogeni associati, trattamenti chimici inappropriati per il controllo dell'acaro, tecniche apistiche scorrette, carenze nutrizionali e stress climatici. I residui di agrofarmaci trovati in alcune matrici apistiche non vengono considerati fattori primari di mortalità, ma solo possibili fattori aggiuntivi a quelli sopra riportati; in ogni caso nella relazione conclusiva si afferma che non è possibile stabilire una correlazione certa tra l'esposizione cronica delle colonie agli agrofarmaci e gli effetti diretti o indiretti di tale esposizione sulle api (AFSSA, 2008).

In Germania è stata avviata nel 2004 un'indagine che coinvolge 120 apicoltori e 1200 colonie distribuite lungo l'intero paese, la cui conclusione è prevista nel 2009. I primi risultati hanno rilevato che i fattori che più probabilmente producono le perdite delle famiglie di api sono varroasi e patogeni associati, nose-miasi e scorrette tecniche apistiche ([http://www.staff.uni-marburg.de/~ag-biene/Zwischenbericht\\_DEBI-MO\\_2004\\_2008\\_Dez08.pdf](http://www.staff.uni-marburg.de/~ag-biene/Zwischenbericht_DEBI-MO_2004_2008_Dez08.pdf), in tedesco).

In Italia ad oggi non esiste un sistema di monitoraggio dello stato sanitario degli alveari e dei fenomeni di mortalità o spopolamento, ma solo iniziative singole a carattere regionale e limitate nel tempo. Nell'ambito del Progetto Apenet è prevista invece la messa a punto di una **rete di monitoraggio** nazionale, con moduli localizzati idealmente in ogni regione italiana. Ogni modulo è formato da 5 stazioni, disposte nelle diverse realtà territoriali di ogni regione e costituite da 10 alveari ciascuna (Porrini *et al.*, 2008).

La rete di monitoraggio sarà gestita dal Centro di riferimento per l'Apicoltura dell'IZS delle Venezie, con la collaborazione del DiSTA dell'Università di Bologna.

Nel primo anno di attività ci si è orientati ad attivare un modulo di monitoraggio per ciascuna regione e provincia autonoma, cercando peraltro di coinvolgere nella rete eventuali progetti nazionali o locali già attivi o in fase di attivazione, così da ottimizzare le risorse disponibili, con il coinvolgimento di Enti locali, Istituti di ricerca, Istituti Zooprofilattici Sperimentali, Associazioni di categoria. Alcuni esempi sono la rete di monitoraggio delle aree naturali protette finanziata dal Ministero dell'Ambiente e gestita dall'ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), attualmente in fase di attivazione in 4 aree (Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Lazio); le reti di monitoraggio regionali di Lombardia (50 stazioni), Friuli Venezia Giulia (10 stazioni) e Piemonte (una stazione per provincia più tre moduli per la provincia di Verbania), che hanno un loro proprio progetto di monitoraggio, i cui dati potranno confluire con quelli di Apenet; i tre moduli regionali della Toscana, che saranno gestiti dal progetto Apenet, e i contributi della Basilicata nel finanziamento dei moduli della propria regione. A questi potrebbero aggiungersi la regione Umbria e la regione Veneto, per l'attivazione rispettivamente di un secondo modulo e di ulteriori 3 stazioni (Fig. 2).

Allo stato attuale il progetto ha già preso il via con la realizzazione del primo dei quattro sopralluoghi previsti. Durante queste visite vengono valutati alcuni parametri ritenuti importanti per verificare lo stato degli alveari sia in termini di forza che di sanità, tenendo conto delle condizioni meteorologiche dell'area nel periodo antecedente il sopralluogo, delle pratiche agronomiche e dello stato fenologico della vegetazione di interesse apistico. Vengono inoltre prelevati campioni di api, di polline e di cera allo scopo di svolgere gli opportuni esami di laboratorio (analisi patologiche e residuali). I dati raccolti vengono inseriti nell'apposita modulistica comune a tutti i tecnici coinvolti nel progetto e successivamente trasferiti in un software "Apenet" accessibile ai responsabili dei moduli. Nel caso di eventi anomali a carico degli alveari, sono previste inoltre visite supplementari, finalizzate a verificare la situazione e a prelevare i campioni necessari.

Di grande importanza per il controllo dello stato di salute dell'apicoltura è anche il sistema delle **segnalazioni**, come ha dimostrato l'esperienza della primavera 2008 sulle morie causate dalla semina di mais conciato. Il sistema delle segnalazioni prevede che l'apicoltore riporti al Servizio veterinario competente per territorio l'episodio di mortalità e che lo stesso proceda al necessario sopralluogo, alla raccolta di



**Figura 2** - Localizzazione delle stazioni di monitoraggio della rete nazionale Apenet (in rosso). In colore grigio sono indicate le stazioni delle reti di monitoraggio regionali di Piemonte, Lombardia e Friuli Venezia Giulia.

campioni, alla loro adeguata conservazione ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e all'invio in laboratorio (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, ASL, ecc.) per le analisi del caso. Qualora sia necessaria la raccolta anche di campioni vegetali, non è chiaro quale sia l'autorità di competenza, ma

secondo una recente nota del MiPAAF dovrebbero essere gli uffici periferici dell'ispettorato centrale per il controllo della qualità dei prodotti agroalimentari, almeno per quanto riguarda la ricerca di eventuali concianti contenenti i prodotti fitosanitari caute-

lativamente sospesi (MiPAAF.SVIRIS.REGISTRO UFFICIALE.0009692.21-04-2009).

Però, ad esempio, in Emilia Romagna, presso la Direzione generale agricoltura, Servizio produzioni animali, è stato redatto un protocollo di intervento per i casi di sospetto avvelenamento di alveari (Prot. AAG/APN/10557 del 22 marzo 2004), indirizzato ai tecnici dei Servizi Veterinari e di quelli Fitosanitari, che, richiamando la Circolare dell'Assessorato Agricoltura regionale del 17/12/1992, prot. 31024/4.2, reca le indicazioni operative per intervenire in caso di segnalazione di moria "asintomatica" di api e per procedere all'eventuale accertamento della violazione e alla relativa procedura sanzionatoria. In questo caso l'autorità preposta al prelievo di campioni vegetali è il tecnico del Servizio Fitosanitario regionale, che può anche procedere al sopralluogo dell'azienda agricola, all'ispezione dei registri dei trattamenti e al prelievo di campioni dei prodotti fitosanitari utilizzati.

Attualmente il sistema delle segnalazioni è poco omogeneo e limitato ad alcune realtà territoriali (in particolare nel Centro-Nord), ma allargandolo a tutta l'Italia e uniformando il più possibile i criteri di valutazione e indagine, anche attraverso la collaborazione

con le associazioni di apicoltori e l'organizzazione di corsi mirati, potrebbe costituire un valido ausilio nel rilevamento delle emergenze in apicoltura.

Direttamente collegata al sistema delle segnalazioni è la **Squadra di Pronto Intervento (SPI)**, prevista nell'ambito del progetto Apenet, che interviene direttamente sul luogo ove l'apicoltore ha segnalato il danno alle api, raccogliendo informazioni e campioni per le analisi (Fig. 3). Tale intervento viene effettuato nei casi in cui l'evento segnalato, sulla base del colloquio con l'apicoltore, risulti di origine sconosciuta; quest'anno sono stati tenuti in particolare considerazione i casi verificatisi in concomitanza con le semine del mais, in relazione al decreto di sospensione dei prodotti concianti.

La squadra è formata da un esperto del CRA-API o del DiSTA Università di Bologna e un tecnico apistico competente di patologie, più eventuali altre figure di supporto. Trattandosi di un'attività di ricerca, i rilievi e la raccolta dei campioni possono essere effettuati anche senza la presenza del pubblico ufficiale, ma per i campioni vegetali è necessaria l'autorizzazione da parte del proprietario degli appezzamenti delle colture sospettate di essere state trattate. È ovvio, come già



**Figura 3** - La Squadra di Pronto Intervento impegnata nei rilievi e nel prelievo di campioni in seguito ad un apicidio.

detto in precedenza, che il campionamento ha valore ufficiale solo se eseguito dal veterinario dell'ASL o dal tecnico fitosanitario competente per il territorio.

La segnalazione o la richiesta di intervento da parte della SPI può essere richiesta dai singoli apicoltori, dalle Associazioni di apicoltori o da strutture pubbliche (ASL) e le richieste devono pervenire alla sede del CRA-API di Bologna. Gli interventi coprono tutto il territorio nazionale, ma sono necessariamente limitati nel numero.

Le azioni relative al monitoraggio e alla sensibilizzazione nei confronti del ricorso alle segnalazioni di morie, che si intende mettere a punto con il progetto Apenet, rappresentano un primo approccio per la definizione di un sistema permanente di controllo dello stato di salute dell'apicoltura italiana. Si auspica infatti che, terminato il progetto, tali azioni vengano proseguite nel tempo, trovando fonti di finanziamento stabili.

### ***Api e mais conciato***

Tra gli obiettivi del progetto Apenet, il più immediato è la valutazione dell'impatto della semina di mais conciato sulla salute degli alveari, in relazione al decreto di sospensione dello scorso 17 settembre 2008.

Come riportato in precedenza, la principale causa di mortalità primaverile delle api negli areali maidicoli italiani degli scorsi anni è stata la dispersione di polveri contenenti insetticidi durante la semina del mais conciato. Anche in Germania, nella regione del Baden-Württemberg, Alsazia e Baviera, durante la primavera 2008 un incidente verificatosi nel periodo della semina del mais ha causato la perdita di circa 11.500 alveari, coinvolgendo quasi 700 apicoltori, con un danno stimato di 2 milioni di euro. Le analisi condotte sui campioni di api morte hanno rilevato la presenza di residui di clothianidin e, in seguito a ciò, le autorità competenti hanno sospeso in maniera cautelativa i principali prodotti usati per la concia delle sementi ([http://www.bvl.bund.de/cln\\_007/nn\\_496790/EN/08\\_PresseInfothek\\_engl/01\\_Presse\\_und\\_Hintergrundinformationen/Hintergrundinformation\\_Bienensterben\\_engl\\_20080715.html\\_nnn=true](http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_496790/EN/08_PresseInfothek_engl/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/Hintergrundinformation_Bienensterben_engl_20080715.html_nnn=true)). L'incidente è stato attribuito ad un errore nelle operazioni di concia del seme, che ha determinato un'eccessiva abrasione del principio attivo in fase di semina e il suo conseguente rilascio nell'ambiente. In seguito a questo incidente sono state avviate ulteriori sperimentazioni sui rischi connessi alla semina di sementi trattate. Il Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL) ha disposto infatti la raccolta di nuovi dati riguardanti l'abrasione di prin-

cipio attivo dai semi conciatati, l'emissione di polveri durante la semina, le dinamiche di dispersione delle polveri nell'ambiente, la contaminazione delle matrici vegetali (acqua, polline, nettare e foglie), delle api e di altri organismi non target e l'effetto delle guttazioni delle plantule di mais. Allo stato attuale la sospensione per i neonicotinoidi è ancora in atto, mentre per semi conciatati con prodotti contenenti il principio attivo methiocarb è stato stabilito un limite di polverosità di 0,75 g/100.000 semi ed è stata pubblicata una lista di macchine seminatrici modificate che sono state certificate per ridurre l'emissione di polveri del 90% ([http://www.bvl.bund.de/cln\\_007/nn\\_496790/sid\\_69BD77E5E591862CA3BB3776C51CE6A6/EN/08\\_PresseInfothek\\_engl/01\\_Presse\\_und\\_Hintergrundinformationen/PI\\_Maissaatgut\\_Mesuroel\\_engl.html\\_nnn=true](http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_496790/sid_69BD77E5E591862CA3BB3776C51CE6A6/EN/08_PresseInfothek_engl/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/PI_Maissaatgut_Mesuroel_engl.html_nnn=true)). Al Federal Research Centre for Cultivated Plants - Julius Kühn-Institut le ricerche per gli effetti sulle api sono comunque ancora in corso.

Altri Paesi interessati dal fenomeno sono stati la Slovacchia, l'Austria e la Svizzera, che hanno subito incidenti simili a quelli avvenuti in Germania e hanno adottato analoghe precauzioni, e la Francia, dove un incidente durante la semina di mais si era verificato nell'aprile 2003 nella regione dei Midi-Pyrénées, dovuto a una partita difettosa di sementi conciate con Regent (fipronil). In questo paese il fipronil è stato successivamente riammesso all'uso, purché il seme rispettasse il limite di polverosità di 3g/100 kg di seme e venisse seminato solo con macchine seminatrici dotate di deflettori che deviano l'aria a terra.

Analogamente agli altri paesi colpiti, anche in Italia si intende procedere ad una accurata valutazione del rischio per le api in seguito all'uso di sementi conciate, misurando la quantità di polveri contenenti principio attivo rilasciate nell'ambiente durante la semina con seminatrice pneumatica e gli effetti di tali quantità sulle api.

A tale scopo è stato messo a punto presso il CRA - Unità di ricerca per l'ingegneria agraria di Roma (CRA-ING), in collaborazione con il CRA - Centro di ricerca per la patologia vegetale di Roma (CRA-PAV) un protocollo che prevede la semina sequenziale di parcelle sperimentali di mais, conciato con i 4 principi attivi oggetto della sospensione, la successiva quantificazione delle polveri e del principio attivo emessi durante la semina e la valutazione degli effetti su api adulte e alveari posti a distanze crescenti dal campo seminato. Inoltre verrà studiata la persistenza nel suolo delle sostanze attive oggetto di studio, la loro traslocazione e bioaccumulo nel mais seminato, come anche la presenza su piante spontanee, appetibi-

li per le api, presenti nei dintorni degli appezzamenti sperimentali.

Le sperimentazioni di campo sono iniziate nel mese di aprile e i primi risultati saranno disponibili a fine estate.

Sulla base anche delle esperienze fatte negli altri paesi, il primo parametro da tenere sotto controllo per evitare la dispersione di polveri contaminate è la **polverosità del seme**. Pertanto le sementi da utilizzare nelle prove vengono sottoposte al test di misurazione della polverosità mediante cilindro di Heubach. Il limite di polverosità fissato è di 3 g/100 kg, analogo a quello adottato in Francia e Germania. In base ad accordi presi con le case produttrici dei principi attivi (Bayercropscience, Syngenta e Basf) e con le ditte sementiere, solo le sementi che rispettano tale limite potranno essere utilizzate nelle prove. La polverosità dei semi viene misurata anche a distanza di tempo dalla concia, per valutare la stabilità del trattamento nel tempo, e viene calcolata la relazione tra polverosità del seme e dispersione di polveri nell'ambiente.

Il secondo elemento da considerare per la **dispersione delle polveri in campo** è la macchina seminatrice. Il rilascio di polveri avviene con l'aria in uscita dalla bocchetta del depressore delle macchine seminatrici a funzionamento pneumatico. Sulla base delle indicazioni fornite dalle ditte produttrici di macchine seminatrici e dai rappresentanti dei contoterzisti, per le sperimentazioni viene usata una seminatrice pneumatica Matermacc a sei file, identificata come uno dei modelli più diffusi e rappresentativi in Italia.

La macchina seminatrice è dotata di un sistema di riduzione della polverosità, chiamato "dual pipe deflector", un deflettore atto a convogliare l'aria in uscita dal depressore (e le polveri in essa contenute) verso il terreno anziché in alto (Fig. 4). Il dispositivo è stato messo a punto dalla ditta Syngenta ed è previsto in Francia come modifica obbligatoria per le macchine usate nella semina di mais conciato. Le prove vengono effettuate sia con la macchina standard che in seguito all'applicazione del deflettore.

La quantificazione delle polveri rilasciate viene effettuata sia mediante "prove a punto fisso", ponendo dei filtri all'uscita del depressore della macchina seminatrice, che sarà azionata ma non in movimento, sia mediante "prove di deriva in campo", in cui, durante la semina di parcelle sperimentali, le polveri disperse vengono raccolte in piastre Petri contenenti una soluzione trappola a base di acetonitrile, poste a distanze crescenti dal punto di semina (da 5 a 50 metri) (Fig. 5). La captazione delle polveri viene effettuata anche per mezzo di una serie di campionatori d'aria muniti



**Figura 4** - Seminatrice pneumatica equipaggiata con il "dual pipe deflector" nel corso di una prova di semina. E' visibile l'effetto deriva dovuto al vento trasversale rispetto alla direzione di semina.

di filtri in "fluoropore", disposti a varie distanze dalla zona seminata, sia a terra che a 170 cm di altezza (Figg. 6 e 7). Dalle quantità di polveri osservate nelle piastre Petri e nei filtri dei campionatori d'aria si potrà valutare la loro dispersione intorno al campo di semina.

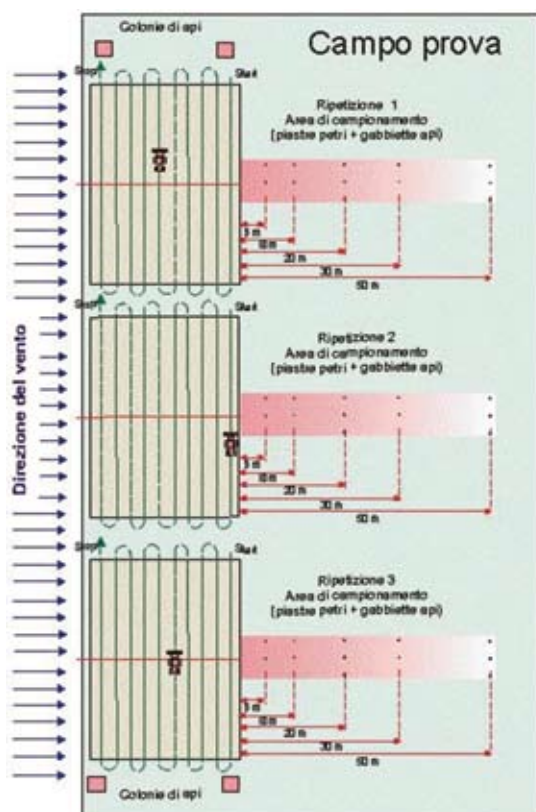
Per la **valutazione degli effetti sulle api** delle polveri rilasciate durante la semina, un certo numero di alveari "sentinella", munito di gabbie underbasket per la raccolta delle api morte, è stato posizionato ai margini del campo seminato e i parametri vitali delle famiglie (mortalità e forza della famiglia) vengono valutati prima e fino a una settimana dopo la semina. Inoltre, accanto a ciascuna piastra Petri è posizionata una gabbietta contenente gruppi di 30-35 api adulte per l'osservazione di eventuali effetti acuti legati all'esposizione alla polvere proveniente dalla seminatrice (Fig. 7).

I filtri per la raccolta delle polveri, le api adulte mantenute nelle gabbiette e le matrici raccolte dagli alveari sentinella (api bottinatrici, larve di ultima età, cera, miele e polline dai favi) saranno analizzati presso il CRA-PAV per valutare la presenza e la quantità dei 4 principi attivi.

Le quantità di polveri e dei principi attivi rilevate nelle prove di campo saranno poi utilizzate in test di laboratorio, svolti presso il CRA-API di Bologna, per verificarne gli effetti letali e subletali sulle api adulte e sulla covata.

Nell'ambito degli studi sul rapporto tra api e mais conciato, verranno effettuate inoltre sperimentazioni per la **valutazione dell'utilità produttiva ed agro-**





**Figura 5** - Disegno sperimentale delle prove di deriva in campo. E' indicata la posizione delle piastre Petri per la captazione delle polveri e degli alveari per la valutazione degli effetti sulle api.

**nomica della concia del mais.** Tali prove, realizzate dal CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura di Bergamo (CRA-MAC), prevedono l'allestimento, in 20 località distribuite per lo più nelle regioni a vocazione maidicola (Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli, Emilia Romagna) e in Toscana, di prove agronomiche parcellari, (parcelle di 30 mq ciascuna, replicate

4 volte) volte a confrontare la resa produttiva di materiali derivanti da semente non concia, rispetto a quella di materiali derivanti da semente trattata con i 4 principi concianti sotto studio. Nelle 20 località individuate verranno elaborate, ove possibile, mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei del mais, grazie alla collaborazione con il DiSTA dell'Università di Bologna, il DIVAPRA dell'Università di Torino e il Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali-Entomologia dell'Università di Padova. Si procederà inoltre alla valutazione della persistenza del principio attivo conciante a vari stadi di sviluppo della pianta di mais. Questa informazione, relazionata ai risultati delle prove di produttività, potrà fornire utili indicazioni sull'effettiva necessità della concia del mais nelle aree sottoposte ad indagine.

### **Api e agrofarmaci**

Quello tra api e agrofarmaci è un rapporto non facile e i metodi di studio per valutare gli effetti di queste molecole sulle api non sempre sono in grado di evidenziare il reale rischio connesso al loro uso. Uno degli obiettivi del Progetto Apenet è di studiare la relazione tra api e agrofarmaci da un punto di vista più ampio e utilizzando protocolli complementari a quelli ufficiali.

Vi sono molti modi in cui le api possono entrare in contatto con i prodotti fitosanitari utilizzati in agricoltura: per contatto diretto con il prodotto irrorato, in seguito a sorvolo dei campi trattati, raccogliendo sostanze contaminate, come nettare e polline sui fiori di piante spontanee in vicinanza delle colture trattate, o melata su foglie e rami, o ancora acqua da pozzanghere, fossi e rugiada.



**Figura 6** - Passaggio del sistema trattore-seminatrice di fronte alla postazione di rilievo a metà parcella. Sono visibili: A, anemometro per il rilievo continuo di direzione e velocità del vento; B, Campionatori d'aria a 5 e 10 m dal bordo della parcella, a terra e a 170 cm di altezza; C, alcune piastre Petri al suolo con accanto le gabbiette contenenti gruppi di 30-35 api esposte direttamente alle polveri.



**Figura 7** - Sinistra: due degli alveari spia posizionati in prossimità del campo di semina. Destra: piastra Petri con la soluzione di acetonitrile, gabbietta con 30-35 api e campionatore d'aria.

Le **procedure di registrazione** degli agrofarmaci sono regolamentate dalla Direttiva Europea 91/414/CEE del 15 luglio 1991, recepita in Italia dal D. L.vo 194 del 17 marzo 1995, successivamente modificato con D.M. del 15 aprile 1996 in attuazione della direttiva della Commissione europea 96/12/CE dell'8 marzo 1996. Tale Direttiva definisce le linee guida per le procedure di approvazione all'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari e, per quanto riguarda le api, prevede una sequenza di saggi di laboratorio, gabbia, tunnel e campo, che permettono di classificare i prodotti fitosanitari secondo quattro categorie: ad alto, medio, basso e nessun rischio.

Recentemente il Parlamento Europeo ha effettuato una revisione della Direttiva 91/414/CEE approvando una nuova legislazione comunitaria sugli agrofarmaci. Per quanto riguarda le api, la nuova direttiva è certamente migliorativa, perché prevede che l'approvazione di un principio attivo avvenga solo nel caso in cui risulti trascurabile il rischio di esposizione per l'ape o non ci siano effetti acuti o cronici inaccettabili per la sopravvivenza e lo sviluppo della colonia (considerando gli effetti sulle larve e sul comportamento delle api). Prescrive inoltre che venga posta particolare attenzione nello studio di protocolli che permettano di valutare il rischio reale degli agrofarmaci per l'ape, in particolare attraverso nettare e polline.

I protocolli da seguire nell'effettuazione dei saggi di tossicità seguono specifiche linee guida sviluppate dalla EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation), le quali stabiliscono i metodi per la valutazione del rischio provocato dai prodotti per la difesa vegetale (Porrini e Sabatini, 2005) (Fig. 8). Fino a diversi anni fa tali protocolli potevano considerarsi sufficienti a stabilire l'effettiva tossicità e

pericolosità verso le api delle sostanze attive, ma oggi, a nostro parere, non è più così. I prodotti immessi sul mercato fino a 15-20 anni fa avevano infatti caratteristiche chimico-tossicologiche differenti da quelli attuali, con per lo più un effetto tossico abbattente che, uccidendo gran parte delle api bottinatrici, limitava l'importazione di sostanze tossiche nell'alveare. Inoltre, l'avvelenamento dovuto a questi principi attivi poteva essere facilmente riconosciuto dall'alta mortalità di fronte all'alveare (apicidiosi).

Diversi principi attivi immessi sul mercato negli ultimi 15 anni presentano invece caratteristiche differenti, sono più selettivi verso i vertebrati, ma possono essere mortali per le api anche a dosi basse, o esplicare effetti sub-letali difficilmente riconducibili alla causa scatenante, come mortalità dilazionata, spopolamento della famiglia, diminuzione del tasso di deposizione nella regina, danni sulle larve, difficoltà nel volo, nell'orientamento, nella comunicazione, ecc.

Alcuni prodotti, oltre a causare la morte delle bottinatrici, possiedono un'azione nefasta anche nei confronti della covata e delle api di casa, che vengono contaminate dai residui che le bottinatrici riescono a portare in alveare. Quando ciò avviene, gli effetti possono rivelarsi anche a distanza di molti mesi, allorché il polline o il nettare contaminato viene consumato. In questo caso si possono ritrovare larve e pupe morte nell'alveare, quando ormai sfugge ogni relazione di causa-effetto.

Rientrano tra questi gli IGR (*Insect Growth Regulators*), i microincapsulati e in generale le sostanze attive con attività sistemica. Gli IGR sono principi attivi che agiscono sugli insetti interferendo a livello ormonale con i loro stessi meccanismi fisiologici; alcuni mimano l'azione dell'ormone giovanile degli

insetti, bloccando lo sviluppo da larva ad adulto (*Juvenile Hormone Analogues*); altri interferiscono con il meccanismo della muta, in particolare inibendo la sintesi di nuova chitina e uccidendo l'insetto durante lo stadio preimmaginale (*chitin synthesis inhibitors*). Queste sostanze non sono tossiche nei confronti delle api adulte ma possono avere un impatto negativo sulla covata e, se vengono riportate all'alveare attraverso il nettare o il polline, possono mettere a repentaglio la sopravvivenza dell'alveare.

I microincapsulati sono prodotti costituiti da microcapsule della dimensione di qualche decina di micron, studiati per rilasciare lentamente nell'ambiente la sostanza attiva in esse contenuta, quando la pellicola d'acqua che le avvolge si asciuga. Il vantaggio di queste formulazioni è che permettono di effettuare un numero minore di interventi fitoiatrici, distribuendo quindi meno prodotto nell'ambiente; lo svantaggio è che le microcapsule possono venire captate dalle api e portate in alveare insieme al polline, provocando una lenta ma inesorabile intossicazione della covata e delle api di casa.

Attualmente non esistono saggi sulla covata ufficialmente riconosciuti dalle linee guida EPPO, in quanto quelli utilizzati nella ricerca non presentano i necessari requisiti di semplicità e riproducibilità. Recentemente è stato però messo a punto un metodo di allevamento in vitro delle larve di ape che ben si presta alla valutazione della tossicità sulla covata degli agrofarmaci (Fig. 9). Studiati da un gruppo di ricerca francese, questo saggio è attualmente oggetto di un ring test internazionale (Aupinel *et al.*, 2005, 2007a, 2007b).

La pericolosità dei neonicotinoidi nei confronti delle api è invece dovuta principalmente a due fattori: l'elevata tossicità e la sistemicità. I **principi attivi**

**sistemici**, traslocando nelle diverse parti della pianta, possono giungere al polline e al nettare e quindi essere ingeriti dalle api bottinatrici e riportati all'alveare, estendendo il rischio all'intera famiglia.

Sono in molti a ritenere che l'attuale normativa non tenga sufficientemente conto dei rischi posti dai prodotti sistemici, in quanto non valuta in modo specifico gli effetti legati a questo tipo di esposizione, che avviene attraverso l'alimento, può avere un effetto differente sulle diverse categorie di api e può verificarsi anche a distanza di tempo dal trattamento.

E' poi facilmente intuibile che per i principi attivi ad elevata tossicità, quali sono i neonicotinoidi, carenze o sottovalutazioni nelle prove tossicologiche previste per la registrazione del prodotto possono rivelarsi molto pericolose per le api e per l'ambiente in generale. Infatti, i saggi di tossicità sono obbligatori solo quando si ipotizzi un possibile contatto delle api con il prodotto, mentre non sono necessari quando tale contatto è escluso a priori. Un chiaro esempio di sottovalutazione del rischio è il recente caso della dispersione di principio attivo durante la semina di mais conciato, la cui eventualità non era stata presa in considerazione nelle procedure di valutazione per la registrazione dei prodotti usati per la concia, che venivano pertanto considerati a rischio trascurabile per le api. Da questo episodio emerge chiaramente la necessità di protocolli specifici per i prodotti sistemici e per quelli utilizzati nei trattamenti al suolo e nella concia delle sementi. Da alcuni anni un gruppo di ricercatori francesi sta lavorando ad un *Risk assessment scheme* specifico per gli insetticidi sistemici applicati nel suolo o come concia (Alix e Vergnet, 2007). Sono anche stati messi a punto saggi specifici per le moleco-



**Figura 8** - Gabbietta sperimentale per i saggi classici di laboratorio per la valutazione della tossicità acuta degli agrofarmaci verso le api.



**Figura 9** - Larve di ape allevate in vitro per l'esecuzione di saggi di tossicità sulla covata.

le sistemiche, che in Francia sono stati riconosciuti tra i metodi ufficiali (Giffard e Dupont, 2008), ma molto lavoro rimane ancora da fare.

I recenti avvenimenti, legati soprattutto all'utilizzo dei neonicotinoidi, hanno evidenziato un'ulteriore carenza dei saggi tossicologici per la registrazione dei prodotti. Il criterio di valutazione del rischio per le api si basa sugli effetti letali degli agrofarmaci, mentre risulta sempre più evidente come i moderni insetticidi esplicino anche **effetti sub-letali** che possono risultare ancora più dannosi verso le api. L'inserimento di test sub-letali nelle procedure di registrazione è ostacolato dalla difficoltà di trovare procedure semplici e standardizzabili per lo studio di questi effetti (Pham-Delègue, 2002; Thompson e Maus, 2007). Attualmente per le api non esistono protocolli riconosciuti per la valutazione degli effetti subletali, sebbene alcuni test di laboratorio si presterebbero a tale scopo, essendo facilmente standardizzabili e riproducibili, come ad esempio il PER test (*Proboscis Extension Reflex*, Fig. 10) (Decourtye e Pham-Delègue, 2002). Viceversa gli studi comportamentali di campo, che valutano l'azione degli agrofarmaci sull'orientamento delle api e la capacità di ritorno all'alveare, oltre a essere di esecuzione più complessa, sono anche più soggetti agli agenti esterni e quindi non risultano facilmente standardizzabili, ma applicabili perlopiù ad un contesto di ricerca (Bortolotti *et al.*, 2003; Desneux *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Nell'ambito del progetto Apenet si tenterà pertanto di valutare gli agrofarmaci di uso più comune, e in particolare di quelli appartenenti alle categorie sopra



**Figura 10** - Esecuzione del PER test.

descritte, utilizzando metodi sperimentali che prendano in considerazione gli effetti sul comportamento e quelli esplicati a dosi subletali. Tali ricerche sono affidate al DiSTA Università di Bologna e al CRA-API di Bologna.

Un altro elemento da considerare sono gli **effetti sinergici**. L'azione di un agrofarmaco sulle api può infatti essere attenuato o aggravato da altri fenomeni non facilmente controllabili, quali lo stato sanitario della famiglia, la disponibilità e la qualità del pascolo, le condizioni climatiche. A causa di questa concomitanza di fattori, anche un agrofarmaco applicato in dosi non pericolose può provocare danni alle api o comportamenti anomali che si rivelano letali per la famiglia.

Anche nello studio delle origini della CCD viene chiamata spesso in causa la multifattorialità e diversi ricercatori si stanno rivolgendo verso lo studio degli effetti sinergici di più fattori applicati contemporaneamente. Studi recenti hanno dimostrato che la temperatura di allevamento della covata può avere un impatto rilevante sulla fitness degli adulti sfarfallati. Larve di ape esposte durante lo sviluppo pre-immaginale ad una temperatura inferiore di un solo grado a quella ottimale, danno origine ad adulti meno longevi e più suscettibili all'avvelenamento da agrofarmaci (Medrzycki *et al.*, 2008).

Con il progetto Apenet si intende quindi studiare non solo l'effetto degli agrofarmaci sulle api, ma anche l'interazione di questi con altri fattori di stress.

Si valuterà pertanto l'impatto della temperatura, delle condizioni sanitarie della famiglia e dello stato nutrizionale delle api sulla suscettibilità delle api agli agrofarmaci. La disponibilità del metodo di allevamento in vitro della covata messo a punto da Aupinel e collaboratori e utilizzato anche presso il laboratorio del CRA-API, permetterà di stimare l'effetto dei diversi fattori somministrati in momenti differenti del ciclo di sviluppo delle api.

### **Api e patologie**

Tra le cause di mortalità e spopolamento delle colonie verificatesi negli ultimi anni, le patologie continuano a rivestire un ruolo di primaria importanza. Una recrudescenza dell'infestazione da varroa, nuovi patogeni o patogeni emergenti, come *Nosema ceranae* (Higes *et al.*, 2006), o una combinazione di questi con altri fattori sono oggetto di studio da parte di diversi ricercatori nel mondo. Nel caso delle morie registrate in Italia nel periodo autunnale o invernale, sebbene le indagini finora svolte non abbiano chiarito con sicurezza le cause del collasso, si ipotizza che la

varroa e i virus associati siano tra i maggiori responsabili (Nazzi, 2008; Lodesani *et al.*, 2008). Non si possono tuttavia escludere altre cause, sia di ordine patologico che non. In questo senso risulta promettente un approccio metagenomico all'individuazione dei patogeni e parassiti presenti all'interno dell'alveare, già applicato in un recente studio svolto negli Stati Uniti (Cox-Foster *et al.*, 2007). L'approccio consiste nell'estrarre dai campioni raccolti da alveari morti per cause ignote il materiale genetico e sequenziarlo al fine di individuare e classificare gli organismi patogeni presenti.

Nell'ambito del progetto Apenet, all'interno delle attività di ricerca che trattano del rapporto tra api e patologie, si prevede di adottare un approccio metagenomico, finalizzato al sequenziamento dell'RNA estratto da campioni di api, provenienti dagli alveari utilizzati per il monitoraggio e dislocati in tutte le regioni italiane, al fine di compilare una sorta di inventario degli agenti patogeni presenti negli alveari italiani (Fig. 11). L'identità dei patogeni, determinata mediante pirosequenziamento, sarà confermata mediante tecniche standard (PCR). Verranno analizzati in particolare campioni di api provenienti da apiari interessati da fenomeni di collasso delle colonie, per individuare i parassiti e i patogeni presenti negli stessi, mentre appropriate tecniche statistiche permetteranno di verificare la significatività della coincidenza fra la presenza di un determinato patogeno e fenomeni di collasso.

Le sperimentazioni verranno svolte presso il Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante dell'Università di Udine e il Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri" dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Sempre nell'ambito del tema api e patologie verranno

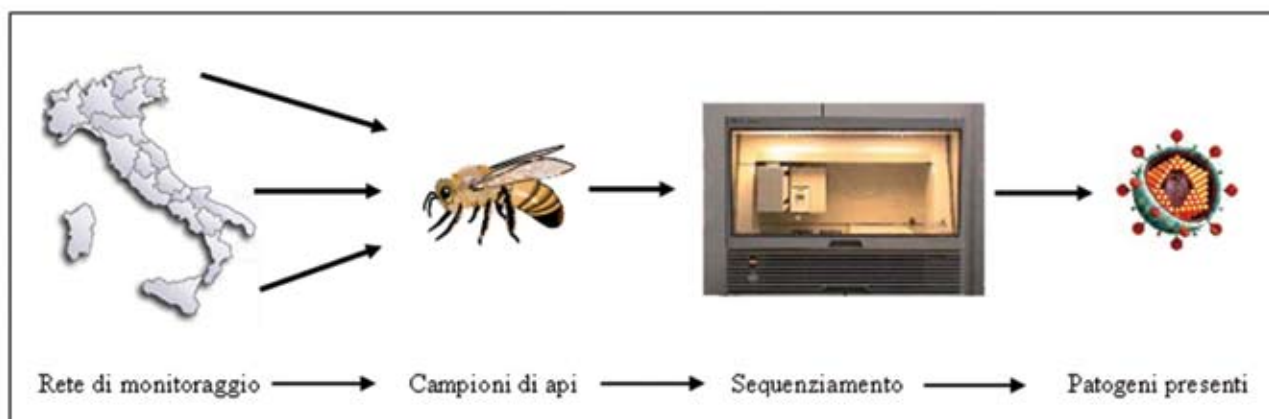
indagate a fondo le interazioni fra ape, patogeni ed eventuali vettori. L'elemento di novità nell'approccio allo studio dei patogeni che si intende sviluppare nel progetto Apenet, è che la semplice presenza del patogeno non è di per sé sufficiente a determinare una malattia. Nel binomio ape/patogeno, infatti, si inserisce un terzo elemento: lo stato di salute dell'ape e il suo sistema immunitario.

Il principio alla base di questo approccio è che gli agenti patogeni, quali che siano, possono produrre effetti negativi sulle colonie d'api ed eventualmente condurle al collasso solo quando riescono a prevaricare le difese immunitarie dell'insetto; questa circostanza può verificarsi più facilmente nel caso in cui il sistema di difesa sia temporaneamente depresso a causa di vari fattori. Da questo punto di vista è già stato dimostrato come l'acaro *Varroa destructor* eserciti sulle api un'azione immunosoppressiva che può aggravare l'effetto di agenti patogeni come il virus delle ali deformi (Yang e Cox-Foster, 2005).

Perciò si ritiene che lo studio della risposta immunitaria dell'ape nei confronti dei vari patogeni coinvolti nel fenomeno dello spopolamento degli alveari potrebbe fornire informazioni essenziali per comprendere i meccanismi che determinano la transizione fra infezioni latenti, comuni e sostanzialmente innocue, a infezioni conclamate, potenzialmente letali per la colonia.

Queste informazioni potrebbero rivelarsi fondamentali per individuare possibili strategie di intervento per prevenire i fenomeni di moria delle api.

In quest'ottica si ritiene che potrebbe risultare particolarmente efficace un approccio che preveda l'utilizzo di tecniche adeguate ad affrontare lo studio a tutti i livelli potenzialmente interessanti: dal gene fino alla colonia passando per i trascritti genici, le proteine, le cellule ed il singolo organismo (Fig. 12).



**Figura 11** - Procedura per la realizzazione di un inventario dei patogeni a partire dagli alveari della rete di monitoraggio Apenet.

A tale scopo verrà studiata la risposta immunitaria di *A. mellifera* ad infezioni virali e di altri patogeni, mettendo a punto metodi affidabili per l'infezione di api in condizioni controllate con protozoi, batteri e virus. Si cercherà quindi di individuare i geni dell'ape coinvolti nella risposta immunitaria e modulati durante la transizione dallo stato di infezione virale latente a quello di malattia conclamata. Tali conoscenze consentiranno di fare chiarezza sui meccanismi molecolari che consentono all'ape di tenere sotto controllo le comunissime infezioni latenti e di definire i cambiamenti che si verificano in questo meccanismo di regolazione allorquando la malattia si manifesta.

Successivamente si valuterà se e come agenti di stress biotico (*V. destructor*) e abiotico (alimentazione non idonea e dosi sub-letali di neonicotinoidi) influenzano le interazioni fra ape e patogeno, modulando geni-chiave coinvolti nei meccanismi di risposta immunitaria. Tali indagini sono di estrema importanza per comprendere quali geni dell'ape siano coinvolti nel controllo della replicazione e diffusione dei virus e se e come il loro profilo di espressione possa essere condizionato da fattori esterni.

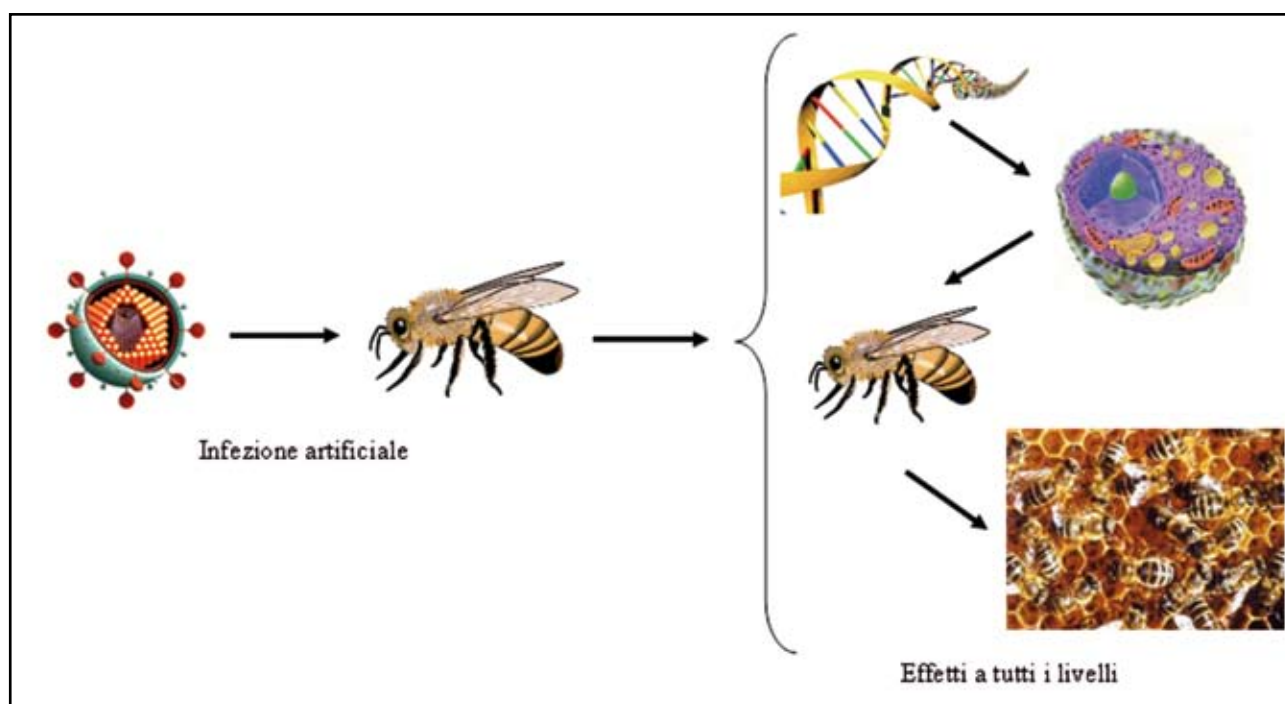
Data la complessità del fenomeno, che interessa contemporaneamente la colonia d'api, i patogeni e i fattori di stress, gli sforzi saranno concentrati soprattutto su un sistema modello che comprende l'ape, il virus delle ali deformi (DWV) e *V. destructor*. Tale sistema appare particolarmente interessante sia per il fatto di essere noto con sufficiente livello di dettaglio, sia

perché è stato dimostrato che il DWV, veicolato da *V. destructor*, può effettivamente provocare il collasso di colonie d'api (Martin *et al.*, 1998). Relativamente alle infezioni da altri agenti patogeni, indagini analoghe potranno essere svolte sul patogeno più frequentemente presente nei campioni provenienti dalla rete di monitoraggio.

L'approccio sperimentale proposto è reso possibile dalle crescenti informazioni di genomica funzionale delle interazioni ospite-patogeno negli insetti (Cherry e Silverman, 2006) e dalla risposta immunitaria dell'ape (Evans *et al.*, 2006), nonché dallo sviluppo di tecnologie avanzate che consentono un'analisi del genoma e del trascrittoma ad un livello di dettaglio molto elevato, che apre una nuova era nello studio della regolazione genica e della genomica funzionale (Graveley, 2008).

### *Api e ambiente*

Lo stato di salute delle api è strettamente correlato con l'ambiente in cui esse vivono. Eventuali variazioni dell'ecosistema possono infatti ripercuotersi sugli organismi che lo abitano, in misura variabile in base alla capacità degli stessi organismi di adattarsi ai cambiamenti. Tra i fattori ambientali che possono esercitare un'influenza sulle api si possono citare le variazioni climatiche, i fattori nutrizionali, la presenza di patogeni e le tecniche apistiche; a loro volta questi fattori possono interagire tra di loro e, con effetto sinergico, amplificare l'impatto esercitato sulle api.



**Figura 12** - Studio degli effetti dell'infezione da patogeni sull'ape a tutti i livelli, dal genoma all'alveare.

Uno dei fattori che limita maggiormente la crescita e lo sviluppo di una colonia è la **disponibilità di fonti alimentari**, cioè polline e nettare, che è a sua volta influenzata dalle condizioni ambientali e climatiche, come la gestione del territorio, la temperatura, la disponibilità d'acqua e di luce. Inoltre, per un corretto sviluppo dell'alveare è importante la diversità delle specie botaniche che forniscono il polline, per garantire alle api uno spettro aminoacidico completo nella dieta (Fig. 13). Questa biodiversità, già di per sé assente nelle zone caratterizzate da monocoltura, può venire meno in periodi di siccità, e inoltre lo stress subito dalle piante può abbassare il valore nutritivo del loro polline.

La carenza di adeguate fonti alimentari può influenzare lo stato di salute della colonia rendendola più soggetta a stress di altra natura; allo stesso modo, un adeguato apporto proteico è in grado di lenire gli effetti di altri fattori di stress (Wehling *et al.*, 2006). Colonie soggette a stress nutrizionali risulteranno quindi più vulnerabili alle **patologie**, come la varroa. La riduzione della covata conseguente alle carenze nutritive, soprattutto di tipo proteico, può portare, nel periodo estivo, a una maggiore diffusione di virus. Le api adulte nate da larve pluriparassitizzate e virosate presenteranno una fisiologia alterata che le rende meno resistenti e spesso non in grado di sviluppare le caratteristiche proprie delle api invernali (Bowen-Walker e Gunn 2001; Amdam *et al.*, 2004); in questo caso le ripercussioni si avranno anche nella successiva stagione autunno-invernale. Inoltre, come già riportato, la parassitizza-



**Figura 13** - Favo con pollini di diversa origine botanica.

zione da varroa influenza negativamente la risposta immunitaria dell'ape, rendendola più vulnerabile agli agenti microbici (Yang e Cox-Foster, 2005; Shen *et al.*, 2005), determinando l'insorgenza di virosi (Ball e Allen, 1988) e inducendo la replicazione di virus già presenti nell'ape.

Le infestazioni multiple di varroa con altri patogeni sono inevitabili, data l'ubiquità del parassita, ma anche altri parassiti, come il microsporide di recente introduzione *Nosema ceranae*, ritenuto da alcuni autori come il più probabile responsabile del fenomeno di spopolamento (Higes *et al.*, 2008), è stato trovato nella maggior parte degli alveari colpiti da CCD negli Stati Uniti (Cox-Foster *et al.*, 2007) e in Europa sembra addirittura aver rimpiazzato il microsporide autoctono, *Nosema apis*. E' quindi verosimile che possano essersi instaurati meccanismi di interazione tra questo e altri parassiti, oltre che con altri fattori.

L'infestazione da varroa, e presumibilmente anche da altri parassiti e patogeni, è poi fortemente influenzata dalle **condizioni climatiche**. L'innalzamento delle temperature invernali osservato negli ultimi anni (Lodesani, 2008) può aver reso disponibile covata per la riproduzione di varroa in momenti in cui essa era normalmente assente, con il risultato di prolungare la durata della stagione riproduttiva per l'acaro con le inevitabili conseguenze sullo sviluppo dell'infestazione (Nazzi, 2008). In condizioni normali, infatti, nei mesi in cui è presente covata, i livelli d'infestazione crescono secondo la regola del raddoppio mensile del numero di acari, con possibili piccole variazioni del tasso da 1,8 a 2,2. Il prolungamento del periodo di allevamento della covata (e quindi la possibilità di un maggior numero di cicli riproduttivi dell'acaro) possono aver portato a colonie con un elevato numero di acari anche durante l'inverno. Poiché il valore critico di 3500 varroe, oltre al quale iniziano alterazioni irreversibili a livello fisiologico, anche ad opera dei virus, si può raggiungere già a luglio quando vi sono appena 100 acari svernanti, o addirittura in giugno se le colonie svernano con 200-250 acari, ne deriva che l'innalzamento delle temperature invernali può portare al collasso della colonia prima che l'apicoltore effettui il controllo di fine inverno, a causa di un progressivo accumulo di acari dall'anno precedente (Lodesani *et al.*, 2008).

Bisogna poi tenere presente che l'ape è una specie allevata, e pertanto, tra i fattori ambientali che possono esercitare un effetto sul suo stato di salute, occorre comprendere anche la **gestione apistica** da parte dell'apicoltore, che può essere a sua volta influenzata da altri parametri ambientali. Per fare un esempio, l'elevata infestazione da varroa dell'estate 2007, unitamen-

te alla notevole siccità nei mesi di luglio e agosto e la conseguente carenza di fonti alimentari per le colonie (soprattutto polline per l'allevamento della covata), ha fatto sì che molti apicoltori interrompessero precocemente la produzione per iniziare i trattamenti. Trattamenti che, a causa del fenomeno della reinfestazione, sono stati protratti anche oltre il consueto periodo, con frequenza ravvicinata e con svariate sostanze, andando a disturbare l'allevamento delle api invernali. I fattori climatici e quelli legati all'intervento umano potrebbero quindi da un lato aver favorito la riproduzione delle forme virali responsabili del collasso delle colonie, dall'altro aver stressato chimicamente le colonie in un momento in cui vengono allevate le api invernali (Lodesani *et al.*, 2008).

La stessa **gestione fitosanitaria** dell'alveare può avere un impatto negativo sulla salute dell'alveare. Infatti le sostanze acaricide (sia naturali che di sintesi) introdotte negli alveari per la lotta contro la varroa possono comportare alterazioni fisiologiche importanti, tali da modificare le strategie di sviluppo della famiglie, soprattutto se prolungati nel tempo.

Nell'ambito del progetto Apenet, al fine di determinare il ruolo dei vari fattori implicati nel benessere delle api, si valuteranno presso il CRA-API di Bologna le ripercussioni delle più significative variazioni dell'ecosistema, sia singolarmente che in sinergia tra loro, sulle colonie. Verranno presi in considerazione i seguenti parametri: variazioni micro-climatiche, fattori nutrizionali e interazioni fra patogeni quali varroa-virus e nosema-virus.

I parametri micro e macro climatici saranno rilevati per l'intera durata del progetto, in tutte le stagioni, i parametri di sviluppo delle colonie saranno misurati durante le stagioni produttive, mentre i livelli d'infestazione dei parassiti saranno rilevati in specifici momenti idonei a valutare le dinamiche di sviluppo ospite-parasita. Verrà inoltre valutato l'impatto di diversi metodi di gestione delle colonie sulle variazioni interne dei parametri microclimatici e l'influenza di tali variazioni sullo sviluppo dei patogeni nelle colonie stesse. I dati raccolti verranno anche confrontati con i dati storici e con quelli rilevati dalla rete di monitoraggio. Per la stima degli effetti di infestazioni multiple, verranno allestiti apiari sperimentali in zone consone al tipo di infestazione richiesto, da cui prelevare le api necessarie alle prove in vitro. Su queste api saranno applicate tecniche d'infezione artificiale, seguite dalla misurazione dei livelli d'infezione e di parametri quali longevità, titolo di ormoni e di proteine nell'emolinfa.

La stima degli effetti dei trattamenti acaricidi sui parametri fisiologici e biochimici delle api autunnali

verrà effettuata introducendo negli alveari le sostanze acaricide (naturali e/o di sintesi) comunemente utilizzate per la lotta contro la varroa. La valutazione degli effetti dei trattamenti verrà fatta tramite elettroforesi bidimensionale su campioni di gelatina reale prodotta da api nutrici esposte ai farmaci oggetto di indagine, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria dell'Università di Pisa.

Ai fattori esterni all'alveare bisogna poi aggiungere quelli interni, ovvero la capacità dell'ape di reagire alle variazioni ambientali e ai patogeni. I fattori sopra menzionati agiscono infatti su una popolazione di api la cui **diversità genetica**, a livello europeo, è fortemente ridotta, a causa delle pratiche di miglioramento genetico che hanno selezionato le colonie ritenute migliori a partire da poche linee genetiche. Anche le importazioni da altri paesi di migliaia di regine all'anno ha creato notevoli problemi di contaminazione genetica nelle regine autoctone. Inoltre spesso le caratteristiche selezionate dagli allevatori, come la docilità e l'elevata produttività, vanno spesso a discapito di altre caratteristiche, come quelle necessarie alla colonia per resistere alle infestazioni o superare le avversità. Ad esempio la produzione di abbondante covata e la precocità della ripresa primaverile sono caratteristiche altamente desiderabili per l'apicoltore e quindi soggette a selezione attiva nei centri specializzati (Lodesani, 2004). Tali caratteristiche sono però anche vantaggiose per la varroa, di cui favoriscono una infestazione precoce e un elevato tasso riproduttivo.

Anche la variabilità genetica delle popolazioni di api selvatiche in Europa è probabilmente ridotta a causa della presenza della varroa. Infatti poiché la regina di ape si può accoppiare con diversi fuchi fino ad una distanza di alcuni chilometri dall'alveare, lo scambio di materiale genetico tra popolazioni allevate e popolazioni selvatiche, potrebbe aver fatto perdere a queste ultime alcune caratteristiche importanti per la difesa della colonia dai fattori di stress.

Come gli altri organismi, anche le api sono adattate al territorio in cui vivono, del quale sono quindi maggiormente abili a fronteggiare avversità e cambiamenti. Viceversa in apicoltura è diffusa la pratica di utilizzare regine di diversa origine geografica, che non tiene conto del fatto che le popolazioni locali sarebbero probabilmente in grado di tollerare meglio le situazioni avverse. Per questo motivo, è importante valutare l'esistenza di interazioni tra genotipo delle api allevate e ambiente, e individuare le caratteristiche di tolleranza agli stress ambientali delle popolazioni autoctone. Inoltre, alla luce dei probabili cambiamenti



climatici in atto, sarebbe utile ottenere informazioni sulle modalità di reazione delle colonie di api alle condizioni climatiche caratterizzate da temperature invernali elevate e prolungati periodi di siccità, osservabili in sottospecie che si sono evolute in condizioni naturali di questo tipo, quali la razza siciliana *A. m. siciliana* (Fig. 14).

Nel progetto Apenet la verifica delle possibili interazioni genotipo-ambiente verrà realizzata mediante lo studio dei parametri di sviluppo di colonie in funzione dell'origine geografica e la valutazione del ruolo della biodiversità genetica nella capacità di adattamento agli stress ambientali. A tale scopo ci si avvarrà della rete di monitoraggio, eventualmente costituita con degli apiari ad hoc in cui distribuire regine con genotipo noto, provenienti da diverse zone climatiche d'Italia. Verranno poi confrontati i parametri di sviluppo e la vitalità delle colonie nei diversi ambienti, congiuntamente alle condizioni sanitarie (livelli d'infestazione e infezione). Ci si attendono utili riscontri anche dall'osservazione e analisi della sottospecie autoctona siciliana, *A. m. siciliana*, e dai confronti in loco con la sottospecie commercialmente utilizzata *A. m. ligustica*, anche in termini di capacità di reazione ai principali patogeni.

Un fattore talvolta citato tra le possibili cause della sindrome da spopolamento è l'influenza dei **campi elettromagnetici**. Ricerche svolte presso l'Istituto di Scienze Naturali dell'Università di Landau hanno rilevato che le radiazioni emesse dai cellulari hanno un'influenza negativa sulla capacità di homing e la forza della famiglia (in termini di peso e quantità di api) (Stever *et al.*, 2006). Gli alveari esposti alle radiazioni,



**Figura 14** - *Apis mellifera siciliana*.

infatti, presentavano un sviluppo più lento e un tempo di ritorno all'alveare più lungo, per cui si ipotizza che le radiazioni abbiano interferito con il sistema d'orientamento degli insetti. D'altra parte è noto che le api sono in grado di rilevare i campi magnetici terrestri ed è stato anche dimostrato che l'applicazione di magneti sul tetto di arnie razionali produce una rotazione nell'allineamento dei favi, la cui inclinazione varia se viene invertita la polarità (Rumsey, 2005).

Tuttavia gli studi effettuati fino ad oggi hanno dato risposte contrastanti e non definitive al problema, pertanto si è ritenuto utile prevedere all'interno del progetto Apenet una sperimentazione, in collaborazione con l'Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara" del Consiglio Nazionale delle Ricerche, individuando una o più aree interessate dalla presenza di numerose sorgenti di campi elettromagnetici (elettrodotti, stazioni di diffusione radiotelevisiva, stazioni radio base per la telefonia cellulare), nella quale siano presenti o possano essere portati un numero sufficiente di alveari. Verranno poi definiti appositi indici sintetici di esposizione, sviluppando opportuni modelli per la stima delle emissioni prodotte dalle diverse sorgenti in ciascuna località. Contemporaneamente sarà valutato lo stato di salute degli alveari presenti, basandosi su specifici parametri (mortalità, forza della famiglia in termini di api adulte e covata, presenza di scorte) e si valuterà l'eventuale correlazione con i livelli di emissione e di esposizione stimati.

#### ***Tavolo di confronto permanente***

Nel progetto Apenet grande importanza è attribuita ai momenti di incontro e di confronto, sia interni che pubblici. Per questo motivo nell'ambito del progetto è previsto un tavolo di incontro permanente per l'individuazione dei problemi e la progettazione di strategie di intervento, trasversale rispetto alle diverse schede e attività di progetto. Tale tavolo sarà costituito dai responsabili partecipanti al progetto, da rappresentanti del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e da rappresentanti delle Associazioni Apicoltori individuate in accordo con il MiPAAF, in particolare FAI e UNAAPI. A queste ultime si chiederà di rappresentare la situazione e le esigenze di volta in volta provenienti dal campo per mettere a fuoco alcune priorità e modalità di intervento, mentre i responsabili di ricerca si avvarranno del tavolo per informare con periodicità circa gli sviluppi dell'attività svolta. In particolare, coerentemente con gli obiettivi del progetto, le Associazioni Apicoltori

dovranno individuare e segnalare quelle che, dal loro punto di osservazione, costituiscono le emergenze del settore per quanto riguarda la salute delle api. Questi dati serviranno innanzitutto per individuare idonei strumenti di analisi per esplorare metodicamente su scale locale e nazionale tali problemi salienti. Per questa fase di indagine ci si avvarrà oltre che della collaborazione delle Associazioni, anche della rete di monitoraggio che costituisce parte integrante di que-

sto progetto. Si prevede anche di organizzare uno o più incontri con referenti europei, sia per quanto attiene il piano operativo che di ricerca, per confrontare la situazione dei diversi Paesi vicini e le diverse strategie messe in atto. Il progetto è stato inoltre presentato in occasione di convegni nazionali e internazionali ed eventi pubblici in materia di apicoltura. Gli incontri organizzati fino ad oggi e le occasioni di presentazione del progetto sono riportate in Tabella 1.

**Tabella 1** - Incontri e seminari organizzati nell'ambito del progetto Apenet, e occasioni di presentazione del progetto al pubblico.

Data	Luogo	Tema dell'incontro
5 dicembre 2008	Sede MIPAAF	Incontro di presentazione del Progetto Apenet ai rappresentanti dei Ministeri, delle Regioni, delle Associazioni di categoria e dei portatori di interesse.
15 gennaio 2009	Sede Ministero della Salute, Roma	Incontro tra i ricercatori CRA impegnati nelle linee di ricerca sulla semina di mais conciato, i rappresentanti del Ministero di Agricoltura e Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità, per definire le modalità delle sperimentazioni.
24 gennaio 2009	San Rossore (PI)	Presentazione del progetto Apenet all'interno del convegno "Dove non volano le api".
28 gennaio 2009	Sede CRA di Roma	Incontro di avvio delle attività del progetto Apenet, con particolare riferimento alle ricerche riguardanti il rapporto tra api e mais conciato.
9 febbraio 2009	Sede CRA di Roma e Sede MIPAAF	Incontro tra i ricercatori APENET e rappresentanti di Agrofarma-Federchimica, UNACOMA, UNIMA, ENAMA, CONFAL, ditte sementiere, per definire le prove sugli effetti della semina di mais conciato sulle api. Incontro sullo stesso argomento con i rappresentanti del MiPAAF, del Ministero della Salute e dell'ISPRA.
25 febbraio 2009	Milano	Presentazione del programma di monitoraggio delle morie degli alveari nella regione Lombardia.
3-5 marzo 2009	Zagabria (HR)	Presentazione del progetto Apenet durante il 4° incontro del gruppo Internazionale COLOSS (Prevention of honeybee COLony LOSSes).
10 marzo 2009	Sede MIPAAF - Roma	Incontro con i rappresentanti delle Regioni (Assessorati all'Agricoltura) per la presentazione del progetto Apenet e per valutare il loro coinvolgimento nella rete di monitoraggio nazionale Apenet.
12 marzo 2009	Sede CRA-API, Bologna	Corso per i responsabili dei moduli della rete di monitoraggio Apenet per definire le modalità di gestione degli apiari e di rilevamento dei dati.
5 aprile 2009	Legnaro (PD)	Presentazione del progetto Apenet all'interno del convegno "L'apicoltura: monitoraggio e ricerca, fitofarmaci, tutela delle produzioni e controllo della varroasi".
22 aprile 2009	Università di Udine	Incontro tra i rappresentanti delle principali associazioni di apicoltori, i delegati del MiPAAF e i responsabili delle schede di ricerca "Api e patologie" per discutere tematiche di ricerca di interesse comune.
26 aprile 2009	Nervesa della Battaglia (TV)	Presentazione del progetto Apenet all'interno del convegno dell'Associazione produttori apistici trevigiani (APAT).
21-22 maggio 2009	Università di Udine	Workshop su allevamento di pupe di api in condizioni artificiali e tecniche di infezione con virus e infestazione con acari.
25-26 maggio 2009	Amsterdam (NL)	Presentazione del progetto Apenet all'interno del Workshop "Honey bee monitoring implementation issues" WG1 del progetto COST-COLOSS.
12 giugno 2009	Università di Napoli	Seminario "Transmission and Pathogenesis of Honeybee Viruses and their possible role in Honeybee Colony Collapse Disorder (CCD)", nell'ambito della scheda di ricerca "Api e patologie" del Progetto Apenet.
16 giugno 2009	Villanova di Cepagatti (PE)	Presentazione del progetto Apenet all'interno del XII convegno specialistico ApiAbruzzo 2009 - Nuovi scenari per l'apicoltura abruzzese.
16 giugno 2009	Università di Ancona	Presentazione del progetto all'interno del Workshop "La sindrome dello spopolamento degli alveari e moria delle api", nell'ambito del XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia.

## Conclusioni

Scopo finale del Progetto Apenet è fornire strumenti scientifici e operativi necessari per la salvaguardia dell'apicoltura. Per questo il gruppo di lavoro che ne fa parte raccoglie le maggiori competenze nei vari settori della ricerca apistica, provenienti da Enti pubblici e Università, con la collaborazione degli Enti locali e delle Associazioni di categoria. Questa trasversalità di competenze e il continuo scambio di informazioni è il punto di forza del progetto, che mira così a studiare non solo i singoli fattori responsabili dei fenomeni di mortalità, ma anche le interazioni tra i diversi fattori di rischio, nonché le possibili soluzioni pratiche.

## Bibliografia

- AFSSA, 2008 - Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. [www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-MortaliteAbeilles.pdf](http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-MortaliteAbeilles.pdf).
- ALIX C., VERGNET C., 2007 - Risk assessment to honey bees: a scheme developed in France for non-sprayed systemic compounds. *Pest management science*, Vol. 63 (11): 1069-1080.
- AMDAM G.V., HARTFELDER K., NORBERG K., HAGEN A., OMHOLT S.W. 2004 - Altered Physiology in worker honey bees (Hymenoptera:Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari:Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J.Econ. Entomol.*, 97: 741-747.
- AUPINEL P., FORTINI D., DUFOUR H., TASEI J. N., MICHAUD B., ODOUX F., PHAM-DELÉGUE M.-H., 2005 - Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58(2): 107-111.
- AUPINEL P., FORTINI D., MICHAUD B., MAROLLEAU F., TASEI J.-N., ODOUX J.-F., 2007A - Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. *Pest management science*, Vol. 63 (11): 1090-1094.
- AUPINEL P., MEDRZYCKI P., FORTINI D., MICHAUD B., TASEI J.N., ODOUX J.F., 2007B - A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia*, XC: 91-94.
- BALL B.V., ALLEN M.F., 1988 - The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.*, 113: 237-244.
- BORTOLOTTI L., MONTANARI R., MARCELINO J., MEDRZYCKI P., MAINI S., PORRINI C., 2003 - Effects of sublethal imidacloprid doses on honey bees' (*Apis mellifera* L.) homing rate and foraging activity. *Proceedings 8<sup>th</sup> International Symposium "Hazards of Pesticides to Bees"*, 4-6 September 2002, Bologna, Italy. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 63-67.
- BORTOLOTTI L., SABATINI A.G., TESORIERO D., MEDRZYCKI P., SGOLA STRA F., PORRINI C., 2008 - Spring honeybee losses in Italy. *Abstracts of the 3<sup>rd</sup> European Conference of Apidology EURBEE*, 8-11 September 2008, Belfast (UK): 14.
- BOWEN-WALKER P.L., GUNN A., 2001 - The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Ent. Exp. Appl.*, 101: 207-217.
- CHERRY S, SILVERMAN N., 2006 - Host pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nature Immunol.*, 7: 911-917.
- COX-FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E.C., PALACIOS G., EVANS J.D., MORAN N.A., QUAN P.-L., BRIESE T., HORNIG M., GEISER D.M., MARTINSON V., VANENGELSDORP D., KALKSTEIN A.L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J., CUI L., HUTCHISON S.K., SIMONS J.F., EGHOLM M., PETTIS J.S., LIPKIN W.I., 2007A - A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318 (5848): 283-287.
- DEL BENE G, TESORIERO D., SABATINI A. G., 2008 - Approccio alla individuazione delle cause della sindrome dello spopolamento degli alveari (CCD Colony Collapse Disorder) con riferimento alle onde elettromagnetiche. *Apoidea* 5 (2): 70-77.
- DESNEUX N., DECOURTYE A., DELPUECH J.-M., 2007 - The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual review of entomology*, 52: 81-106.
- EVANS J. D., ARONSTEIN K., CHEN Y. P., HETRU C., IMLER J.-L., JIANG H., KANOST M., THOMPSON G. J., ZOU Z., HULTMARK D., 2006 - Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 645-656.
- GIFFARD H., DUPONT T., 2008. Behaviour of honeybees: a guideline to assess troubles in bee foraging activity under insect-proof tunnels. *10th International Symposium "Hazard of pesticides to bees"*, October 8-10 2008, Bucharest, Romania.
- GRAVELEY B. R., 2008 - Power sequencing. *Nature*, 453: 1197-1198.

- HIGES M., MARTIN R., MEANA A., 2006 - *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 93-95.
- HIGES M., MARTIN-HERNÁNDEZ R., BOTÍAS C., GARRIDO BAILÓN E., GONZÁLEZ-PORTO A. V., BARRIOS L., DEL NOZAL M. J., BERNAL J. L., JIMÉNEZ J. J., GARCÍA PALENCIA P., MEANA A., 2008 - How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10, 2659-2669.
- LODESANI M., 2004 - La pratica del miglioramento genetico. In "L'ape regina allevamento e selezione", a cura di Lodesani M., Avenue Media, Bologna, 265-350.
- LODESANI M., COSTA C., FRANCESCHETTI S., 2008 - Mortalità degli alveari: rilevamenti e ipotesi alternative in zone non interessate da avvelenamenti. Dati di un monitoraggio in alcune province dell'Emilia-Romagna. *Apoidea*, 5 (3): 117-124.
- MARTIN S.J., HOGARTH A., VAN BREDA J., PERRETT J., 1998 - A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* L. colonies in the United Kingdom. *Apidologie* 29: 369-370.
- MEDRZYCKI P., MONTANARI R., BORTOLOTTI L., SABATINI A. G., MAINI S., PORRINI C., 2003 - Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bees' (*Apis mellifera* L.) behaviour. Laboratory tests. Proceedings 8<sup>th</sup> International Symposium "Hazards of Pesticides to Bees", 4-6 September 2002, Bologna, Italy. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 59-62.
- MUTINELLI F., SABATINI A.G., ASTUTI M., PORRINI C. 2009 - Neonicotinoids precautionary ban in Italy. *American Bee Journal* 149 (3): 269-270.
- MUTINELLI F., GRANATO A., 2007 - La sindrome del collasso della colonia (Colony Collapse Disorder) negli USA. Un aggiornamento sulla situazione attuale. *Apoidea*, 4: 175-185.
- NAZZI F., 2008 - Varroa e CCD: considerazioni sul possibile ruolo di *Varroa destructor* nella sindrome del collasso della colonia. *Apoidea* 5 (2): 64-69.
- PHAM-DELÈGUE, M-H., DECOURTYE A., KAISER L., DEVILLERS J., 2002 - Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 33: 425-432.
- PORRINI C., SABATINI A. G., 2005 - Api e tossicità da agrofarmaci. *Apoidea*, 2 (2): 79-84.
- PORRINI C., SABATINI A. G., MUTINELLI F., ASTUTI M., LAVAZZA A., PIRO R., TESORIERO D., MEDRZYCKI P., SGOLA STRA F., BORTOLOTTI L., 2009 - Le segnalazioni degli spopolamenti e delle mortalità degli alveari in Italia: resoconto 2008. *Lapis*, XVII (1): 15-19.
- PORRINI C., SGOLA STRA F., SABATINI A.G., 2008 - Rete per il monitoraggio di fenomeni di spopolamento e mortalità degli alveari in Italia (APENET). *Apoidea* 5 (2): 83-87.
- RUMSEY I., 2005 - Bees and Gravitomagnetism (Part 3 and 4). *Apis-UK Issue No.39* September/October 2005.
- SABATINI A. G., ASTUTI M., MUTINELLI F., 2008 - Mortalità di api e spopolamento degli alveari nella primavera del 2008: indagini in Lombardia e nel Triveneto. *Apoidea* Vol. 5 n. 2: 88-90.
- SHEN M., YANG X., COX-FOSTER D., CUI L., 2005 - The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWW) in honey bees. *Virology*, 342: 141-149.
- STEVEY H., KUHN J., OTTEN C., WUNDER B., HARST W., 2006 - Verhaltensänderung unter elektromagnetischer Exposition – Pilotstudie 2005. Unveröffentlichter Forschungsbericht. Landau: Universität, Institut für Mathematik, Arbeitsgruppe Bildungsinformatik. Verfügbar unter <http://agbi.uni-landau.de/materialien> (Change in Behaviour during Electromagnetic Exposure – pilot study 2005. Unpublished research report).
- THOMPSON H., MAUS C., 2007 - The relevance of sub-lethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest management science*, Vol. 63 (11): 1058-1061.
- YANG E. C., CHUANG Y. C., CHEN Y. L., CHANG L. H., 2008 - Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 101 (6):1743-1748.
- YANG X., COX-FOSTER D.L., 2005 - Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS*, 102: 7470-7475.
- WEHLING M., VON DER OHE W., BRASSE D., FORSTER R., 2006 - Intoxication of honeybees – Interactions of plant protection products and other factors. Proceedings of the Second European Conference of Apidology Eurbee, 10-14 September 2006, Prague, Czech Republic: 79.